

09/889845
CT/JP99/06174

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

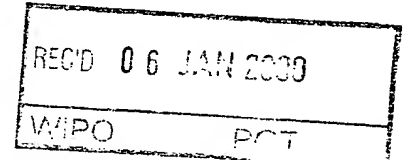
05.11.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 2月10日



出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第032990号

出 願 人
Applicant (s):

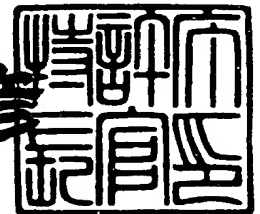
日水製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3085377

【書類名】 特許願

【整理番号】 NSM0034

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成11年 2月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 7/00
A61K 39/00

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市楠5丁目4-22

 【氏名】 庄司 省三

【特許出願人】

 【識別番号】 000226862

 【氏名又は名称】 日水製薬株式会社

 【代表者】 富本 善久

【代理人】

 【識別番号】 100099139

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 光来出 良彦

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 012209

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9707613

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

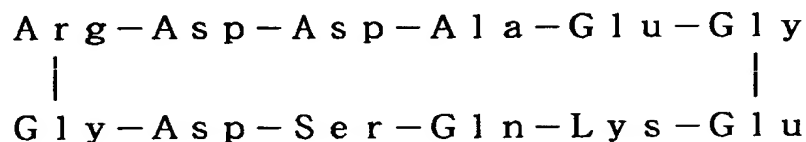
【発明の名称】 環状ペプチド及びエイズワクチン

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノ酸配列 $\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Asp}-\text{Asp}-\text{Arg}$ を含むペプチド及びアミノ酸配列 $\text{Ser}-\text{Gln}-\text{Lys}-\text{Glu}-\text{Gly}$ を含むペプチドから選ばれた1種又は2種のペプチドを連続した構成鎖として含む環状ペプチド。

【請求項2】 下記の式で示される環状ペプチド。

【化1】



【請求項3】 前記環状ペプチドに含まれるカルボキシル基、アミノ基及び水酸基から選ばれた活性基が置換基に結合されている請求項1又は2記載の環状ペプチド。

【請求項4】 前記置換基が、

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ の脂肪酸残基 ($n: 0-20$)、及び

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ のアルコール残基 ($n: 0-20$)、並びにこれらの化合物残基の不飽和化合物残基から選ばれたものである請求項3記載の環状ペプチド。

【請求項5】 請求項1記載の環状ペプチドを有効成分とするエイズワクチン。

【請求項6】 請求項2記載の環状ペプチドを有効成分とするエイズワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、H I V-1 ウイルスのヒト感染防止に有効な環状ペプチド及びエイズワクチンに関する。さらに詳しくは、C X C R 4 及びC C R 5 と呼ばれ第2 受容体を介してH I V-1 ウイルス感染を中和させることができる中和抗体を産出させるための抗原としての環状ペプチド、及び該抗原を有効成分とするエイズワクチンに関する。

【0002】

【従来の技術】

エイズの病原性ウイルス（H I V-1 ウイルス）がヒト感染時に利用する第2 受容体（セカンドレセプター）が1996年に発見されている（Yu Feng et al., Science, 272, 872-877, 1996）。この第2 受容体はすでに報告されているケモカイン受容体のうちC X C R 4 及びC C R 5 と呼ばれている2種類の受容体である。H I V-1 ウイルスは、どちらか一方の受容体を利用して吸着侵入し、ヒトのリンパ球、マクロファージ、樹状細胞に感染することが分かっている。

【0003】

一方、コーカサス人の約1～2%の人々にH I V-1 ウイルスの感染に対して抵抗性を示すことが報告され、その原因はケモカイン受容体である第2 受容体（C X C R 4、C C R 5）の遺伝的欠損あるいは遺伝的不完全性によるものであることが判明している（Rong Liu, et al., 86, 367-377, 1996）。

【0004】

これらの知見から、H I V-1 ウイルスの感染防止には第2 受容体を中和させることの重要性が着目され、近年該第2 受容体を中和させることができる中和抗体を産出させる試みがなされている。しかしながら、現在までこのような中和抗体の産出に成功した報告は見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明は、第2 受容体タンパク質の構成ペプチドを一平面的にとらえるような従来の手法を行わず、第2 受容体タンパク質のループ構造に着目し、立体的視点から第2 受容体を中和させることができる中和抗体をインビボで産出させることができる立体的な抗原を提供すること、及び該抗原を有効成分とするエイ

ズワクチンを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、T-細胞系における第2受容体（略語：CXCR4）及びマクロファージ系細胞における第2受容体（略語：CCR5）のモデルを組立て、立体的視点から観察した。そこで、第2受容体タンパク質分子中の第2小ループを構成する2個のペントペプチドとして、T-細胞系由来のGlu₁₇₉-Ala₁₈₀-Asp₁₈₁-Asp₁₈₂-Arg₁₈₃と、マクロファージ系細胞由来のSer₁₆₉-Gln₁₇₀-Lys₁₇₁-Glu₁₇₂-Gly₁₇₃が、第2受容体を中和させることができるHIV-1ウイルス感染抑止抗体の産出のための新規な抗原の構成要素として利用可能であるかどうかについて着目した。

【0007】

図1は、T-細胞系の第2受容体タンパク質分子の該細胞膜上の配置（図1左上段）と、マクロファージ系細胞の第2受容体タンパク質分子の該細胞膜上の配置（図1右上段）と、これらの第2受容体タンパク質分子の各第2小ループのペプチドから合成された本発明の環状ドデカペプチドを示す。図1においてT-細胞系の第2受容体タンパク質分子（CXCR4）は第1ループ、第2ループ、第3ループ及び第2小ループからなる立体構造を有し、またマクロファージ系細胞の第2受容体タンパク質分子（CCR5）も第1ループ、第2ループ、第3ループ及び第2小ループからなる立体構造を有す。

【0008】

T-細胞系の第2受容体タンパク質分子（CXCR4）中の第2小ループには、アミノ酸配列Glu₁₇₉-Ala₁₈₀-Asp₁₈₁-Asp₁₈₂-Arg₁₈₃が含まれており、またマクロファージ系細胞の第2受容体タンパク質分子（CCR5）中の第2小ループには、アミノ酸配列Ser₁₆₉-Gln₁₇₀-Lys₁₇₁-Glu₁₇₂-Gly₁₇₃が含まれている。

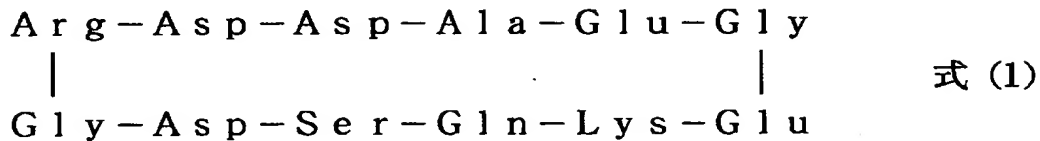
【0009】

前記CXCR4とCCR5の両第2小ループのアミノ酸配列からなる両ペプチドをスペーサーームジペプチドとして-Gly-Asp-を介して環を形成させ

て、本発明の下記の式(1)で示される新規化合物環状ドデカペプチドを得る(図1の下段の環状ペプチド)。

【0010】

【化2】



【0011】

前記式(1)で示される環状ドデカペプチドに含まれるカルボキシル基、アミノ基及び水酸基から選ばれた活性基は、置換基に結合されていることが生体内への吸収及び抗体発現において好ましい。このような置換基は、

$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ の脂肪酸残基($n: 0-20$)、及び

$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_n - \text{OH}$ のアルコール残基($n: 0-20$)、並びにこれらの化合物残基の不飽和化合物残基が選ばれ、生体親和性があるので好ましい。好適な脂肪酸の例には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸及びこれらの不飽和脂肪酸が挙げられ、また、好適な高級アルコールの例には、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、パルミチルアルコール、ステアリルアルコール、エイコサノール及びこれらの不飽和アルコールが挙げられる。

【0012】

前記式(1)で示される環状ドデカペプチドはHIV-1ウイルスの感染抑止性の第2受容体中和抗体を産出するための免疫抗原として利用できる。該免疫抗原について次に述べる。

【0013】

該環状ドデカペプチドを固相樹脂に結合させ、抗体スクリーニング用アッセイ抗原とする。一方、マウスを免疫抗原、例えば、環状ドデカペプチド-マルチプル抗原ペプチド(略語: CDP-MAP)で免疫し、常法のハイブリドーマ法によってモノクローナル抗体を得る。HIV-1ウイルスの感染防止性については

、上記方法で得られた数種のハイブリドーマ（抗体を産生するB細胞と癌細胞ミエローマ細胞との融合細胞）を得、該ハイブリドーマの培養上清を用いて常法により抗HIV-1ウイルス活性を測定することにより、培養上清がHIV-1ウイルスの感染を防止することが認められる。

【0014】

したがって、前記式（1）で示される環状ドデカペプチドは、HIV-1ウイルスの感染抑止効果を有する抗体産出のための免疫抗原として利用可能であるので、エイズワクチンの有効成分として有用である。

【0015】

本発明のエイズワクチンは、アミノ酸配列Glu-Ala-Asp-Asp-Argを含むペプチド及びアミノ酸配列Ser-Gln-Lys-Glu-Glyを含むペプチドから選ばれた1種又は2種のペプチドを連続した構成鎖として含む環状ペプチドを有効成分とすることができる。

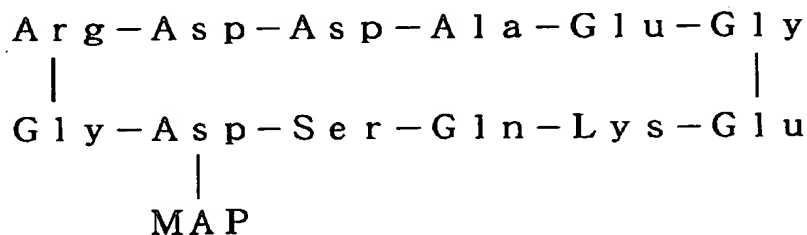
【0016】

本発明のエイズワクチンは、前記環状ペプチドを有効成分とし、該有効成分が置換基及び／又は付加物により修飾され、或いは薬理的に許容される塩となっていてよい。該薬理的に許容される塩には、塩酸、硫酸、硝酸、亜硝酸、臭化水素酸、ヨウ素水素酸、リン酸、有機酸が挙げられる。

前記式（1）の化合物の置換基が高級脂肪酸である場合の例を次に示す。

【0017】

【化3】



式（2）

【0018】

上記式（2）で示す環状ドデカペプチド-MAP 1当量に9-フルオレニルメトキシカルボニルジメチルスルホニウムメチルスルフェート（Fmoc-DSP

: 商品名、Novabiochem 社製) 5 当量を加えて、該環状ドデカペプチド-MAP の K_4 の ϵ -アミノ基をブロックした後、カルボキシ基 (E_5 、 E_7 、 D_9 、 D_{10}) を EDC、DCC、BOP 等で活性化し、過剰の高級アルコール類 [$CH_3(CH_2)_n-OH$] を加えてエステル化する。また上記式 (2) で示す環状ドデカペプチド-MAP の Ser の水酸基を酸クロライド [$CH_3-(CH_2)_n-COCl$] 法によりエステルとして脱 Fmoc した後、ペプチドワクチンの基材として用いる。該ワクチンを生体に投与すると、リンパ組織に移行し、エステルが分解され、元の式 (2) で示す環状ペプチド-MAP となり、該ペプチド-MAP が免疫系を活性化し、抗体を産生し、エイズウイルスの感染を中和することになる。

【0019】

本発明のエイズワクチンは、経口剤或いは非経口剤の形態で医薬組成物として用いることができる。経口剤の形態は、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、マイクロカプセル剤、液剤の形態が挙げられる。また非経口剤の形態は、液剤の形態で主として注射液、或いは座薬の形態で用いる。これらの製剤は、通常、周知の製剤化補助成分、例えば、担体、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、矯味矯臭剤等を添加することができる。

【0020】

その使用量は、症状、年齢により異なるが、経口投与の場合には、一日当たり $0.1 \sim 1000 \text{ mg/kg}$ 体重を通常成人に対して投与することができる。

【0021】

【実施例】

【実施例 1】

(1) HIV-1 第 2 受容体 2 種の第 2 小ループ形成キメラ環状ペプチドの合成

ペプチドの固相合成に用いられる樹脂は、各アミノ酸残基の保護基を傷めず、弱酸でペプチドを遊離できる 2-クロロトリシルクロライド樹脂 0.25 mmol (368 mg) を秤量して用いた。ペプチド合成は Fmoc (9-フルオレニルメトキシカルボニル) ケミストリーに従って、次の 1) ~ 12) の各 Fmoc

側鎖保護アミノ酸 (1.0 mmol) を用いて、ペプチド合成機により全自動でC末端から合成し、Fmoc-側鎖保護ペプチド樹脂を得た。

【0022】

- | | |
|---------------------------------------|----------|
| 1) Fmoc-Gly-OH | 1.0 mmol |
| 2) Fmoc-L-Arg (Pmc)-OH | 1.0 mmol |
| Pmc: 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル | |
| 3) Fmoc-L-Asp (OtBu)-OH | 1.0 mmol |
| OtBu: o-tert-ブチル | |
| 4) Fmoc-L-Asp (OtBu)-OH | 1.0 mmol |
| 5) Fmoc-L-Ala-OH | 1.0 mmol |
| 6) Fmoc-L-Glu (OtBu)-OH | 1.0 mmol |
| 7) Fmoc-Gly-OH | 1.0 mmol |
| 8) Fmoc-L-Glu (OtBu)-OH | 1.0 mmol |
| 9) Fmoc-L-Lys (Boc)-OH | 1.0 mmol |
| Boc: ベンジルオキシカルボニル | |
| 10) Fmoc-L-Gln (Trt)-OH | 1.0 mmol |
| Trt: トリチル | |
| 11) Fmoc-L-Ser (tBu)-OH | 1.0 mmol |
| tBu: t-ブチル | |
| 12) Fmoc-L-Asp (OBzl)-OH | 1.0 mmol |
| OBzl: O-ベンジル | |

前記工程で得られた保護ペプチド樹脂 (300 mg) を酢酸/トリフロロエタノール/ジクロロメタン (1:1:8) 混液 5 ml を加え、室温で 30 分攪拌し、濾過して弱酸で遊離した側鎖保護ペプチドと樹脂に分け、常法に従って濾液にエーテルを加えて、生じた沈殿に適量アセトニトリルを加えて凍結乾燥した。この側鎖保護直鎖ドデカペプチドのC末端Glyのカルボキシル基とアミノ末端Asp (OBzl) のアミノ基を結合させ、環状ドデカペプチドを次のように合成した。

【0023】

側鎖保護直鎖ドデカペプチド 130 mg を 10% トリフロロエタノールを含むジメチルホルムアミド溶液に溶かし、ベンゾトリアゾール-1-オキシトリス- (ジメチルアミノ)-ホスホニウムヘキサフルオロフォスフェート (略語: BOP) をペプチドの 5 倍量加えて 24 時間、室温で放置し反応させ、常法に従って側鎖保護環状ペプチド 80 mg を得た。

【0024】

この側鎖保護環状ドデカペプチドをジメチルホルムアミド 10 ml に溶解し、パラジウム炭素 50 mg を加えて水素ガスで 24 時間接触還元し、常法に従ってカルボキシメチル側鎖保護環状ドデカペプチド (15 mg) を得た。なお、環状ドデカペプチドの確認は全保護基を常法により、脱保護し、レーザーマス (MALDI-TOF 型質量分析計) で確認した。下記の表 1 にレーザーマスによる環状ペプチド及び側鎖 (非環状) ペプチドの理論値及び実測値を示した。図 2 に、環状ペプチド及び側鎖 (非環状) ペプチドの MALDI-TOF 型質量分析スペクトルを示す。この結果 (脱水縮合より、環を形成し、水分子質量 18 が減少する) より環状ドデカペプチドを確認した。

【0025】

【表 1】

	質 量	理 論 値	実 測 値
環状ペプチド	1287.53	1288.53	1288.54
直鎖 (非環状) ペプチド	1305.54	1306.55	1306.73

【0026】

(2) 環状ドデカペプチド-MAP (略語: CDP-MAP) からなる免疫抗原の調製

カルボキシメチル側鎖保護環状ドデカペプチド (略語: CM-SBCDP) のカルボキシル基と MAP-樹脂の 4 分枝ポリリジンのアミノ基を BOP 法により次のようにして結合させた。

【0027】

MAP-樹脂 (0.46 mmol 4分枝ポリリジン/樹脂) 70 mg (32 μ mol) をジメチルホルムアミドで膨潤させ、20%ピペリジン/ジメチルホルムアミド (略語: DMF) 10 ml で3回、MAP-樹脂の脱保護 (脱 Fmoc) を行い、イソプロパノール 5 ml で3回洗浄し、イソプロパノールを除去して4分枝ポリリジンのアミノ末端を露出させた。このMAP-樹脂にカルボキシメチル側鎖保護環状ドデカペプチドジメチルホルムアミド溶液 10 ml (32 μ mol) を加え、BOP法で結合させた。側鎖保護環状ドデカペプチド (略語: SB CDP) -MAP-樹脂に対して常法に従ってトリフルオロ酢酸 (略語: TFA) でペプチドを切り離し、環状ドデカペプチド-MAP (略語: CDP-MAP) 12 mg を得て、抗環状ドデカペプチド (略語: Anti-CDP) モノクローナル抗体を調製するための免疫抗原とした。

【0028】

(3) 抗環状ドデカペプチド (Anti-CDP) モノクローナル抗体を調製するためのアッセイ用抗原であるCDP-ピン樹脂 (クラウン樹脂) の調製

抗CDP単クローン抗体を培養液上清から効率よく作出するためのアッセイ用抗原は、次のようにして調製した。エピトープスキニングキットマニュアル (Chiron Mimotopes Pty Ltd, Clayton, Victoria, Australia) に従って、側鎖保護環状ドデカペプチドをピン樹脂 (クラウン樹脂) の先端の β -Ala に結合させて、CDP-ピン樹脂 (クラウン樹脂) を得た。

【0029】

(4) モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

免疫抗原ペプチドとして環状ドデカペプチド-MAP を用いて Bal/c マウスを基礎免疫し、常法に従い骨髄腫細胞 (P3U1) とポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。融合後、HAT 培地で選別培養し、ハイブリドーマ細胞がコロニーを形成したウエルについて、その培養上清中の抗体価を抗原ペプチドを用いたマルチピンエライザ法により測定し、抗体陽性と判断した細胞群を限外希釈により2回クローニングを行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを常法に従い確立した。基礎免疫は、免疫抗原ペプチド凍結乾燥品を 1 mg

／ml の濃度で PBS (－) に溶解し、これと免疫賦活化剤である Freund 完全アジュバンド (FCA) または Freund 不完全アジュバンド (FIA) と 1 : 1. 2 ~ 1 : 1. 4 の比率で混和し、調和したエマルジョンを用いた。このエマルジョンを 1 週間毎に 1 回、計 4 回 $400\mu\text{l}$ / マウスの用量で腹腔投与を行った。最初の 2 回は FCA、後の 2 回は FIA とのエマルジョンを用いた。最終免疫は、基礎免疫終了後 1 カ月経過してから、免疫抗原ペプチド (MAP) 凍結乾燥品を $200\mu\text{g}$ / ml の濃度で PBS (－) に溶解したものを、 $200\mu\text{l}$ / マウスの用量で尾静脈より投与した。

【0030】

①脾細胞の調製及び細胞融合

脾細胞の調製及び細胞融合は常法に従って行った。最終免疫から 3 ~ 4 日後にマウスを瀉血致死させ、脾細胞を摘出し、HBSS 中でほぐして、溶血バッファ－処理及び遠沈により赤血球を除去したものを脾細胞とした。P3U1 : 脾細胞 = 1 : 8 ~ 1 : 10 の比率で混合し遠沈を行い、得られたペレットにポリエチレングリコール溶液を添加することで融合を行った。融合処理後、HAT 培地に穏やかに懸濁したものを 48 ウェルプレートにまき、 37°C で融合細胞がコロニーを形成するまで培養を行った。

【0031】

②抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

特異抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、免疫抗原ペプチドを固相化抗原として用いるエライザ法による一次スクリーニング及びマルチーピンペプチドを固相化抗原として用いる二次スクリーニングを連続して行うことにより、目的ハイブリドーマを選別した。エライザには、一次抗体としてハイブリドーマの培養上清、二次抗体としてペルオキシダーゼ (POD) 標識抗マウス IgG、発色基質として TMBZ (3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン)、及び発色停止液として $0.3\text{N H}_2\text{SO}_4$ を用い、主波長 450nm 、参照波長 630nm の吸光度を測定した。

【0032】

③目的抗体産生ハイブリドーマのクローニング

スクリーニングアッセイで高い抗体価を示したモノクローナルハイブリドーマ株を、1個/ウエルになるように限外希釈を行い、マウス胸腺より調製した支持細胞とともに96ウエルプレートにまき培養を行った。2回クローニング操作を行ない得られたモノクローナル細胞群に関して、抗原ペプチドを用いたマルチピエンエライザによるスクリーニングを行ない、両者のエライザにおいて最も高い抗体価を示した細胞株をモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとし、その培養上清からモノクローナル抗体を常法にしたがって精製した。本モノクローナル抗体のサブクラスはIgM κ であった。このハイブリドーマは、平成11年2月3日に工業技術院生命工学技術研究所に受託番号FERM P-17198として寄託されている。確立した細胞は拡張し、培養後、液体窒素タンク中で凍結保存した。

【0033】

(5) 抗HIV活性の測定

抗HIV活性は前田らの方法 (Y. Maeda, et al. 12th World AIDS Conference Geneva, Abstract P4, June 28-July 3, 1998) に従って測定した。本発明者が作出した抗CDPモノクローナル抗体を産生する細胞の培養液及びその対照として本抗体を産生しない同細胞の同条件下における培養液を用いた。本抗体を含む培養液 (200 ml) は、HIV-1 ウイルスの感染率を対照と比較して、30分で対照の61%、60分で35%に低下させ、HIV-1 ウイルスの感染性を阻害することが認められた。

【0034】

【発明の効果】

本発明の環状ペプチドは、新規化合物であり、CXCR4及び/又はCCR5と呼ばれ第2受容体を介してHIV-1 ウイルス感染を中和させることができる中和抗体 (抗HIV-1 ウイルス活性のある抗体) を生体内で産出させるための抗原として有用であり、また、エイズワクチンの有効成分として有用である。

【 0 0 3 5 】

【配列表】

- <110> Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.
- <120> Cyclo dodecapeptide and aids vaccine
- <130> NSM0034
- <160> 1
- <210> 1
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220> peptide
- <221> chain
- <300>
- <301> Shozo Shoji
- <302> Synthesis of Cyclo-oligo peptide and its biological aictivity
- <303> Japan Pharmacology Academy Kyushu branch Mass meeting Lecture
summary collection
- <306> 43
- <307> 1998-11-10
- <400> Arg Asp Asp Ala Glu Gly Glu Lys Gln Ser Asp Gly

5

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

T-細胞系の第 2 受容体タンパク質分子の細胞膜上の配置（左上段）と、マクロファージ系細胞の第 2 受容体タンパク質分子の該細胞膜上の配置（右上段）と、これらの第 2 受容体タンパク質分子の各第 2 小ループのペプチドの配列を基にして合成した本発明の環状ドデカペプチドを示す。

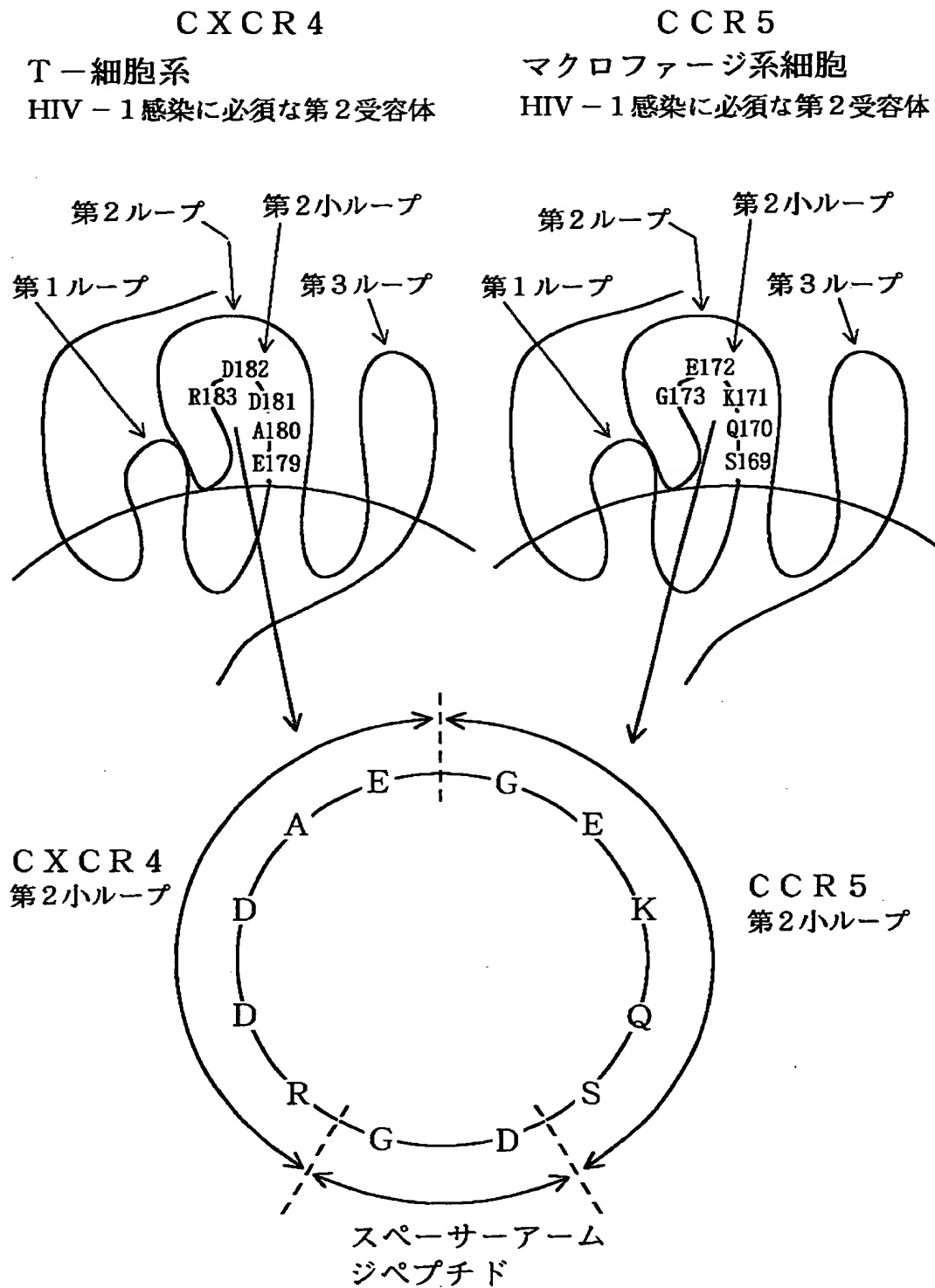
【図 2】

環状ペプチド及び側鎖（非環状）ペプチドのMALDI-TOF型質量分析スペクトルを示す。

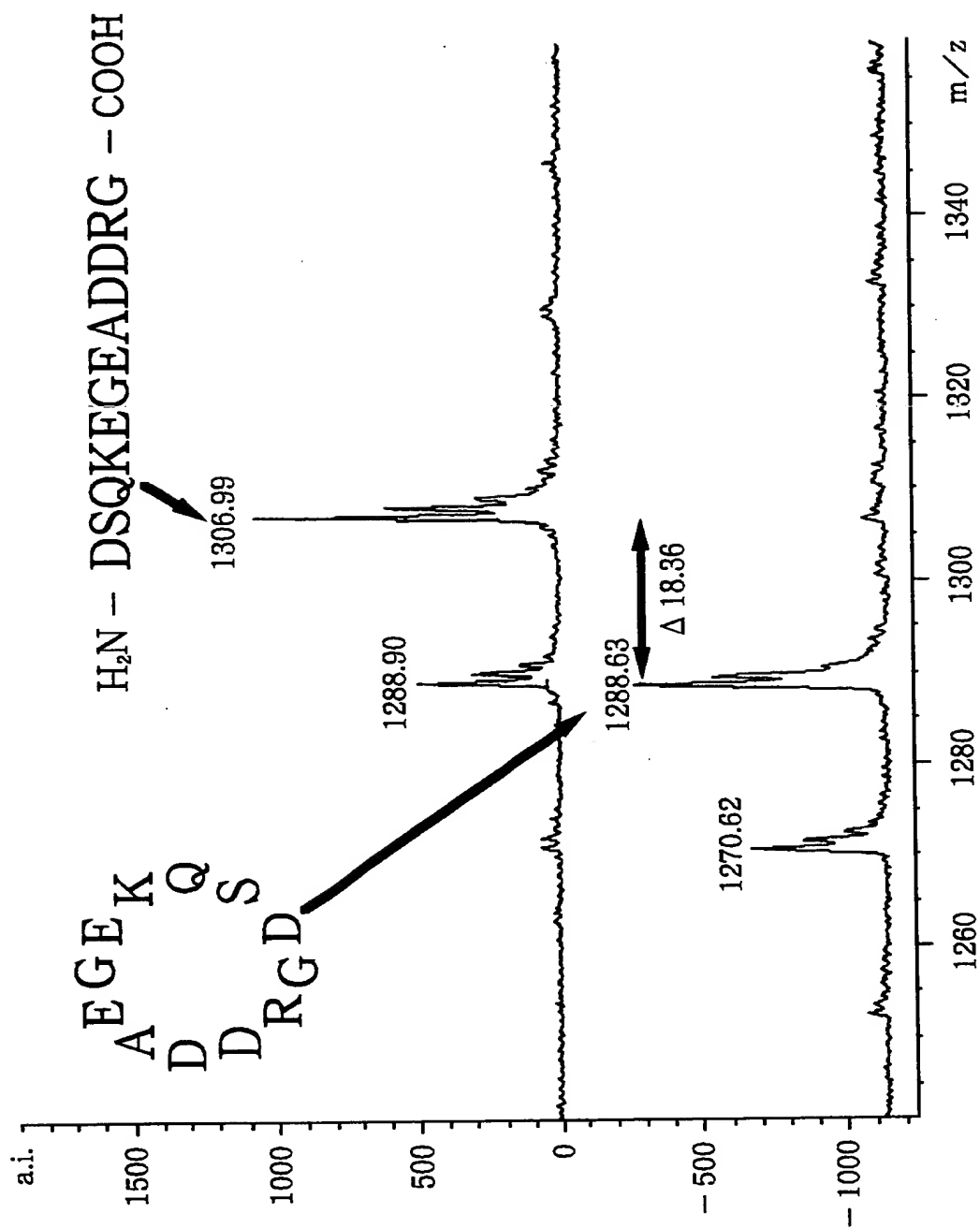
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



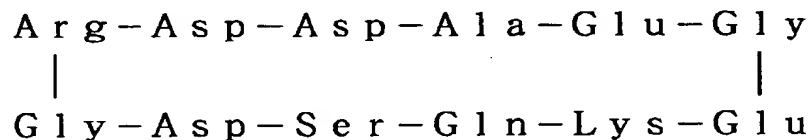
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 エイズの病原性ウイルス（HIV-1ウイルス）がヒト感染時に利用する第2受容体を中和させることができる中和抗体をインビボで産出させるための立体的な抗原を提供し、且つ該抗原を有効成分とするエイズワクチンを提供する。

【解決手段】 Glu-Ala-Asp-Asp-Argを含むペプチド及びSer-Gln-Lys-Glu-Glyを含むペプチドから選ばれた1種又は2種のペプチドを連続した構成鎖として含む環状ペプチド、及び該環状ペプチドを有効成分とするエイズワクチン。好ましくは下記の式で示される環状ドデカペプチド及び該環状ドデカペプチドを有効成分とするエイズワクチン。

【化1】



前記環状ペプチドに含まれるカルボキシル基、アミノ基及び水酸基から選ばれた活性基は、置換基に結合されていることが生体内への吸収及び抗体発現において好ましい。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 NSM0034

【提出日】 平成11年 9月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

 【出願番号】 平成11年特許願第 32990号

【補正をする者】

 【識別番号】 000226862

 【氏名又は名称】 日水製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100099139

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 光来出 良彦

【手続補正 1】

 【補正対象書類名】 明細書

 【補正対象項目名】 0 0 2 3

 【補正方法】 変更

 【補正の内容】 1

【手続補正 2】

 【補正対象書類名】 明細書

 【補正対象項目名】 0 0 3 0

 【補正方法】 変更

 【補正の内容】 2

【手続補正 3】

 【補正対象書類名】 明細書

 【補正対象項目名】 0 0 3 1

 【補正方法】 変更

 【補正の内容】 3

【手続補正 4】

【補正対象書類名】	明細書
【補正対象項目名】	0 0 3 3
【補正方法】	変更
【補正の内容】	4
【ブループの要否】	要

【0023】

側鎖保護直鎖ドデカペプチド 130 mg を 10%トリフロロエタノールを含むジメチルホルムアミド溶液に溶かし、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシートリス-(ジメチルアミノ)-ホスホニウムヘキサフルオロフォスフェート（略語：BOP）をペプチドの5倍量加えて24時間、室温で放置し反応させ、常法に従って側鎖保護環状ペプチド 80 mg を得た。

【0030】

①脾細胞の調製及び細胞融合

脾細胞の調製及び細胞融合は常法に従って行った。最終免疫から3～4日後にマウスを瀉血致死させ、脾細胞を摘出し、HBSS中でほぐして、溶血バッファ―処理及び遠沈により赤血球を除去したものを脾細胞とした。P3U1：脾細胞＝1：8～1：10の比率で混合し遠沈を行い、得られたペレットにポリエチレングリコール溶液を添加することで融合を行った。融合処理後、HAT培地に穏やかに懸濁したものを48ウエルプレートにまき、37℃で融合細胞がコロニーを形成するまで培養を行った。

【0031】

②抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

特異抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、免疫抗原ペプチドを固相化抗原として用いるエライザ法による一次スクリーニング及びマルチピンペプチドを固相化抗原として用いる二次スクリーニングを連続して行うことにより、目的ハイブリドーマを選別した。エライザには、一次抗体としてハイブリドーマの培養上清、二次抗体としてペルオキシダーゼ（POD）標識抗マウスIgG、発色基質としてTMBZ（3, 3', 5, 5' 二テトラメチルベンジジン）、及び発色停止液として0.3N H₂SO₄を用い、主波長450nm、参照波長630nmの吸光度を測定した。

【0033】

(5) 抗HIV活性の測定

抗HIV活性は前田らの方法 (Y.Maeda, et al. 12th World AIDS Conference Geneva, Abstract P4, June 28-July 3, 1998) に従って測定した。本発明者が作出した抗CDPモノクローナル抗体を産生する細胞の培養液及びその対照として本抗体を産生しない同細胞の同条件下における培養液を用いた。本抗体を含む培養液 ($200\mu\text{l}$) は、HIV-1 ウイルスの感染率を対照と比較して、30分で対照の61%、60分で35%に低下させ、HIV-1 ウイルスの感染性を阻害することが認められた。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000226862]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号

氏 名 日水製薬株式会社

